

**APPLICATIONS OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY
(TLC) TO THE SEPARATION AND QUANTIFICATION
OF THE VITAMINS D[♦]
*REVIEW***

**APPLICATIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE EN
COUCHE MINCE (CCM) A LA SEPARATION ET
QUANTIFICATION DES VITAMINES D
*MISE AU POINT***

**Ana M. Hossu^{1*}, Cristiana Radulescu¹, Mihaela Ilie²,
Ionica Ionita¹, Elena I. Moater¹**

*¹ Université „Valahia” Targoviste, Faculté de Sciences et d'Arts,
Département de Chimie, Rue Unirii 18-20, Targoviste, Roumanie*

*² Université de Médecine et Pharmacie „Carol Davila”, Faculté de
Pharmacie, Département de Toxicologie, Rue Traian Vuia 6, Bucarest,
Roumanie*

*Corresponding author: anahossu@yahoo.co.uk

Received: 13/05/2008

Accepted after revision: 16/07/2008

Abstract: At first era of the fortification, too important quantities of vitamin D were introduced in the foods and the medicinal preparations. In addition, overdoses could be explained by the simple one does that these

[♦] Paper presented at the fifth edition of: “Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée – COFrRoCA 2008”, 25 – 29 June 2008, Bacău, Romania.

preparations were free to reach and that certain mothers considered them as of the "tonic" and about it abused. These days, it proves himself that a big one leaves responsibility fall to the manufacturers that masteries little the method of addition and check very poorly the vitamins content D of the marketed forms.

The formations of many isomers and degradation products, as well as the presence of various sources of inherent interferences to the sample type containing vitamins D, complicating extremely the development of methods for dosage of these vitamins.

The thin layer chromatography (TLC) is the oldest chromatographic technique and the separation methods of the vitamins D by this method were comparatively numerous.

Keywords: *vitamin D, thin-layer chromatography, pharmaceuticals*

INTRODUCTION

Les différents systèmes chromatographiques utilisés

En chromatographie en couche mince (CCM), les vitamines D, leurs provitamines ainsi que leurs esters sont facilement altérés par les conditions opératoires; les risques de dégradation, voire de perte par oxydation étant augmentés en exposant les vitamines sur de larges surfaces, à l'air, et ce pendant des périodes assez longues. Ces phénomènes peuvent être minimisés en travaillant dans l'obscurité, sous courant d'azote et à 0 °C [1]. La CCM d'adsorption sur phase normale a été très largement exploitée dans le cadre d'études sur les vitamines D; l'adsorbant le plus couramment utilisé étant la silice. Ce matériau possède une large capacité d'adsorption et permet des séparations fines et rapides d'importantes quantités d'analytes sans occasionner des phénomènes de surcharge des plaques [1]. Janecke et Maass – Goebels [2] ont été les premiers à réaliser des séparations en CCM d'adsorption de mélanges contenant des vitamines D. Ils ont pu séparer ces vitamines de différents stérols, de certaines de leurs produits de dégradation et des carotènes en utilisant des plaques de silicagel G avec différentes phases mobiles: hexane, hexane/acétate d'éthyle (90/10 v/v) et chloroforme. Par la suite, la CCM d'adsorption sur phase normale a été exploitée dans le cadre de séparations de mélanges contenant notamment des vitamines liposolubles (Tableau 1) [1 - 6]. Ces premiers travaux sont à l'origine de l'application de cette technique à l'identification et la quantification de la vitamine D dans des échantillons plus complexes, telles que les matrices alimentaires [7, 8]. La CCM d'adsorption a également permis d'étudier certaines isomérisations auxquelles sont soumises les vitamines D. Ainsi, il a été possible de vérifier les hypothèses émises quant au mécanisme d'isomérisation de la provitamine D en vitamine [9], de la prévitamine en vitamine D et inversement [1, 10, 11], ainsi que du tachystérol en isotachystérol [12 – 14] et d'établir les cinétiques de ces conversions. Cette technique a également été employée pour séparer les vitamines D de leurs métabolites hydroxylés [15]. Aux Etats-Unis, elle est depuis de nombreuses années une des techniques de référence USP pour les tests d'identification des vitamines

D₂ et D₃ [16]. Elle est également utilisée dans le cadre de la mise en œuvre du contrôle de la pureté de la vitamine D₃ marquée par des isotopes radioactifs [17]. Des molécules apparentées aux groupes des vitamines D (stérols, esters de vitamine D etc.) ont pu être séparées de ces dernières sur silice imprégné de nitrate d'argent, la séparation s'effectuant en fonction du nombre de doubles liaisons des molécules [18]. La CCM de partage à polarité de phase inversée a eu peu d'applications dans le cadre de séparation de mélanges de contenant des vitamines D. Les quelques cas références concernent des séparations des vitamines D₂ et D₃ entre elles [1].

Tableau 1. Applications de la CCM sur phase normale à la séparation de mélanges complexes contenant des vitamines liposolubles

Composition des échantillons	Systèmes chromatographiques: phase stationnaire/phase mobile
Extraites lipidiques contenant du cholestérol, des esters de vitamine A, de l'acétate d' α -tocophérol et de la vitamine D [1a]	silicagel cyclohexane/éther diéthylique (1/1 v/v)
Vitamines liposolubles, carotènes, quinones et chlorophylles [1b]	silicagel cyclohexane/éther diéthylique (1/1 v/v) chloroforme, hexane/acétate d'éthyle (1/1 v/v) cyclohexane/chloroforme (6/4 v/v) benzène/méthanol (98/2 v/v)
Vitamines liposolubles [3]	alumine 14 solvants individuels, les meilleures séparations ayant été obtenues avec: le benzène, le toluène, le xylène et le tétrachlorure de carbone
Vitamines A, D et E [4]	silicagel hexane/éthyl-méthyl-cétone/éther dibutylique (34/7/6 v/v/v)
Vitamines liposolubles [5]	silicagel et alumine 13 mélanges de solvants
Vitamines A, D et antioxydants [6]	silicagel imprégné de fluorescéine hexane/éthyl-méthyl-cétone/éther dibutylique (34/7/6 v/v/v) + triéthylamine

Détermination et quantification des vitamines D

Les vitamines D et les composés apparentés peuvent être visualisés à de courtes longueurs d'onde dans le domaine de l'UV quand ils ont été séparés sur des plaques contenant un additif fluorescent on sur de plaques conventionnelles après pulvérisation d'une solution fluorescente comme la rhodamine 6G; en utilisant ce réactif Schachter et coll. ont ainsi pu détecter jusqu'à 0,5 μ g de vitamine D [19].

De nombreux réactifs chimiques ont été employés en CCM pour révéler les vitamines D (Tableau 2) et permettre leur quantification par colorimétrie. L'utilisation du trichlorure d'antimoine, après, après une activation à 120 °C pendant 5 min, a permis de détecter jusqu'à 0,025 μ g de vitamine D; mais ce réactif, comme l'acide sulfurique concentré,

produit des complexes colorés extrêmement instables [1b]. Seul le traitement à l'acide sulfurique concentré, après une activation à 120 °C pendant 3 min, induit des colorations différentes pour les vitamines D₂ et D₃; mais ce traitement présente l'inconvénient de n'être efficace que pour de quantités importantes de vitamines (30 µg). L'acide tungstophosphorique, après activation, permet de différencier les vitamines D qui se colorent en vert brun, de leur provitamines, l'ergostérol se colorant en rouge violacé et le 7-déhydrocholestérol en brun foncé, ainsi que du cholestérol qui prend une coloration rose. Il n'existe pas de réactif qui permette de différencier les vitamines D de leurs prévitamines respectives.

Chen [20] a testé sur des plaques de silicagel G12 réactifs différents, dont le jaune brillant 6G, la fluorescéine et l'acridine. Les plaques ont ensuite été traitées à l'acide sulfurique à 10% dans le méthanol, chauffées et examinées sous lumière UV. Ces réactifs ont essentiellement permis de distinguer les vitamines D des stérols. L'iode [21], la dibromofluorescéine [22] et une solution à base de permanganate et de carbonate de sodium [23] sont également connues en tant que révélateurs des vitamines D, mais leur utilisation a été plus limitée que celles des réactifs précédents.

Il existe des méthodes de quantification approximatives des vitamines D directement sur la plaque de CCM, dont l'intérêt se limite au stade anecdotique du fait de leur imprécision [24]. Heaysman et Sawyer [21] ont ainsi mis au point une méthode "d'estimation visuelle" des teneurs en vitamine D dans des préparations pharmaceutiques, après séparation des produits interférents et révélation à l'acide sulfurique concentré, par comparaison avec une gamme d'étalons chromatographiques à différentes concentrations sur la même plaque de silicagel G.

Tableau 2. Révélateurs chimiques utilisés en CCM d'adsorption (sur plaques de silicagel GF₂₅₄) pour la détection des vitamines D [1a]

Réactif	Activation	Coloration des vitamines D ₂ et D ₃		Limite de détection (µg)
		lumière UV	lumière naturelle	
Trichlorure d'antimoine	120 °C (5 min)	orange	bleu vert	0,025 (lumière UV) 0,3 (lumière naturelle)
Trichlorure d'antimoine	120 °C (1 min) 120 °C (5 min)	- orange	rouge orange -	0,3 0,3
Acide sulfurique concentré	120 °C (3 min)	-	marron (D ₂) et vert (D ₃)	30
	120 °C (5 min)	orange	bleu vert	0,3
Acide tungstophosphorique	70 °C (20 min)	-	vert brun	0,2
Acide molybdophosphorique	120 °C (1 min)	-	bleu vert	0,3
Acide trichloroacétique	120 °C (5 min)	brun	-	0,1 – 0,2
Acide trifluoroacétique	120 °C (5 min)	brun	-	0,1 – 0,2

Au début des années 1970, ont commencé à apparaître des méthodes de dosage des vitamines D au sein de différentes matrices par CCM et densitométrie; la combinaison

de ces deux techniques présentant les avantages d'être de mise en œuvre facile et rapide, et surtout d'être sensible. Koleva et coll. [25] ont ainsi mis au point une méthode de dosage par CCM et densitométrie des vitamines D₂ et D₃ dans des huiles et dans des solutions à usage thérapeutique. Les vitamines D ont été séparées des substances interférentes (produits de dégradation, vitamines A, C et E, acide nordéshydroguarétique, nipagin®, nipasol® et cremophor® EZ) sur plaque de silicagel avec différentes phases mobiles, le chloroforme permettant d'obtenir les meilleurs séparations et les formes de spots les plus adéquates pour la quantification. Les vitamines D ont été révélées à l'aide d'une solution de trichlorure d'antimoine à 22% dans le chloroforme et les mesures ont été réalisées par densitométrie de transmission, bien que ce mode de mesure ne convienne pas à la CCM, les limitations étant dues non seulement au verre des plaques mais aussi au gel de silice lui-même [26]. Ils ont toutefois obtenu une relation linéaire entre les unités d'intégration et les concentrations en vitamines D sur une gamme de 1 à 10 µg. Kouimtzi et Papadoyannis [27] ont également utilisé cette technique pour quantifier les vitamines A, B₁, B₂, D₃ et C dans des préparations pharmaceutiques. Les vitamines ont été séparées sur silicagel G par un mélange de solvants benzène/méthanol/acétone (8/2/1 v/v/v) et les spots fluorescents ont été quantifiés par densitométrie d'émission. Ils ont ainsi obtenu une relation linéaire entre les unités d'intégration et les concentrations en vitamines, sur une gamme de 0 à 10 µg pour la vitamine D₃ et avec pour ces quatre vitamines des limites de détection comprises entre 30 et 70 ng. Autres méthodes de dosage par CCM des vitamines D₂ et D₃ dans des préparations pharmaceutiques ont été élaborées et le travail dans ce domaine n'est pas finalisé [28, 29].

CONCLUSIONS

Jusqu'au début des années 1970, la quantification des vitamines D était réalisée en combinant la CCM avec des méthodes spectrophotométriques (spectrophotométrie d'absorption UV, colorimétrie, spectrofluorimétrie), après leur élution de l'adsorbant sur lequel elles avaient été séparées des substances interférentes. La combinaison de ces techniques a permis de quantifier les vitamines D dans des concentrés irradiés, ainsi que dans des préparations pharmaceutiques et alimentaires, et d'étudier leur métabolisme et leur distribution dans les tissus organiques; ces méthodes présentent les inconvénients d'être longues à mettre en œuvre et souvent entachées d'erreurs systématiques.

RÉFÉRENCES

1. (a) Bolliger, H.R.: *The D Vitamins in Thin Layer Chromatography* (1st ed., E. Stahl ed.), Allen & Unwin Ltd., Berlin-Göttingen-Heidelberg, **1965**, 210;
(b) Bolliger, H.R., Köning, A.: *The D Vitamins in Thin Layer Chromatography* (2nd ed., E. Stahl ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, **1969**, 275;
2. Janecke, H., Maass-Goebels, L.: *Z. Anal. Chem.*, **1960**, 178, 161;
3. Davidek, J., Blattna, J.: *J. Chromatogr.*, **1962**, 7, 204;
4. Strohecker, R., Henning, H.M.: *Vitamin Assay-Tested Method* (Verlag Chemie, Weinheim), **1966**, 275;

5. Hashmi, M.H., Chughtai, F.R., Adil, S.A., Qureshi, T.: *Mikrochim. Acta*, **1967**, III;
6. Johnson, F.C., Vickers, C.: *Analyst*, **1973**, 98, 257;
7. Bekes, F., Berndorfer-Kraszner, E., Lasztity, R., Orsi, F., Dobos, I.: *Nahrung*, **1977**, 21, 27;
8. Czuczy, P., Morava, E.: *Anal. Chem. Symp. Ser.*, **1982**, 483;
9. Norman, A.W., De Luca, H.F.: *Anal. Chem.*, **1963**, 35, 1247;
10. Hanewald, K.H., Mulder, F.J., Keuning, K.J.: *J. Pharm. Sci.*, **1968**, 57, 1308;
11. Ponchon, G., Fellers, F.X.: *J. Chromatogr.*, **1968**, 57, 1210;
12. Kobayashi, T.: *Vitamins*, **1966**, 34, 473;
13. Kobayashi, T., Adachi, A.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **1973**, 19, 311;
14. Kobayashi, T., Adachi, A.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **1973**, 19, 303 ;
15. Jones, G., Seamark, D.A., Trafford, D.J.H., Makin, H.L.J.: *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins* (2nd edn., A.P. De Luyner, W.E. Lambert & J. Nelis eds.), Chromatographic Sciences Series, **1992**, 60, 73;
16. Cholecalciferol & Ergocalciferol in *United States Pharmacopoeia*, 20th ed., Mack Printing, Easton PE, **1980**, 147 et 282;
17. *Product Specifications Literature*, New England Nuclear, Boston MA & Amersham Corporation, Arlington Height IL, **1978**;
18. Sklan, D., Budowski, P.: *Anal. Chem.*, **1973**, 49, 200;
19. Schachter, D., Finkelstein, J.D., Kowarski, S.: *J. Clin. Invest.*, **1964**, 43, 787;
20. Chen, P.S.: *Anal. Biochem.*, **1965**, 37, 301;
21. Heaysman, L.T., Sawyer, E.R.: *Analyst*, **1964**, 89, 1061;
22. Copius-Peeremboom, J.W., Beekes, H.W.: *J. Chromatogr.*, **1965**, 10, 421;
23. Lund, J., De Luca, H.F.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **1964**, 108, 12 ;
24. Bolliger, H.R., Köning, A., *Anal. Chem.*, **1965**, 214, 1 ;
25. Koleva, M., Joneidi, M., Budewski, O., *Pharmazie*, **1973**, 28, 317;
26. Jaenchen, D.E., Issaq, H.J.: *Les Cahiers de Chromatographie*, **1990**, 14, 18;
27. Kouimtzis, T.A., Papadoyannis, I.N.: *Mikrochim. Acta*, **1979**, 1, 145;
28. Hossu A.-M., Radulescu, C., Ilie, M., Balalau, D., Magearu, V.: *Revista de Chimie*, **2006**, 57(11), 1188-1189;
29. Hossu, A.-M., Ilie, M., Radulescu, C., *International Symposium for High Performance Thin-Layer Chromatography, Proceedings*, Berlin, Germany, **2006**.